

**Über den Einfluß des Heparins
auf die Bestimmung der Ribonuclease
im Serum**

Bruno Lorenz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554015_0054

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

ÜBER DEN EINFLUSS DES HEPARINS

AUF DIE BESTIMMUNG DER RIBONUCLEASE

IM SERUM

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Bruno Lorenz
aus München



München 1957

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1957

Herrn Professor Dr. W. SEITZ sei hier für die Überlassung
des Themas und die Übernahme des Referates,
Herrn Privatdozent Dr. N. ZÖLLNER für die liebenswür-
dige Unterstützung und freundliche Beratung bei Ausführung
der Untersuchungen herzlich gedankt.

A. EINLEITUNG

Im Jahre 1912 beobachtete JONES (1), dass das Pankreas ein Enzym enthält, welches aus Nucleinsäuren Nucleotide abspaltet und sich von Phosphatasen dadurch unterscheidet, dass es gegen Erhitzung stabil ist. DUBOS (2) fand dieses hitzestabile Ferment auch noch in anderen Organen und nannte es Ribonuclease. Die Kristallisation einer Ribonuclease aus dem Pankreas gelang erstmals KUNITZ (3) im Jahre 1940.

Die Ribonuclease ist ein basischer Eiweisskörper vom Lösungstyp des Albumins. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 7, 8. Ihr Molekulargewicht beträgt nach KUNITZ (3) 15000; ROTHEN (4) hat es aus Diffusions- und Sedimentationsmessungen als 12700 berechnet.

Die bemerkenswertesten Eigenschaften dieses Fermentes sind gute Löslichkeit in Säure und grosse Unempfindlichkeit gegenüber Behandlung mit heissen verdünnten Mineralsäuren.

Das pH-Optimum liegt bei pH 7, 7. Die für die Reaktion optimale Temperatur beträgt 65 Grad C. Die Ribonuclease ist über einen breiten pH-Bereich wirksam.

Die Spezifität der Ribonuclease wurde ausführlich untersucht, siehe ZÖLLNER (5) und COHN und VOLKIN (6). Genauere Angaben lassen sich noch nicht machen. Aus intakter Ribonucleinsäure (RNS) spaltet die Ribonuclease ausschliesslich Pyrimidinnucleotide, ausserdem spaltet sie die cyclischen 2', 3' - Phosphate der Pyrimidinnucleotide zu den cyclischen Monophosphaten.

MCDONALD (7) zeigte in neuerer Zeit, dass die Spaltung von Cytidin-2', 3' - Phosphat zu Cytidilsäure b eine spezifische Funktion der Pankreas-Ribonuclease ist. Fast gleichzeitig berichtete RICHARDS (8), dass die Ribonuclease neben ihrer depolymerisierenden Wirkung auf die Ribonucleinsäure Uridin - 2', 3' - Phosphat zu Uridin - 3' - Phosphat (b-Nucleotid) zu hydrolysieren vermag. Er mass die Fermentaktivität optisch bei 280 nm. 50 % Hydrolyse entsprechen einer Extinktionsän-

derung von 0,150. Das Reaktionsprodukt sowie ortho-Phosphat hemmen die Fermentwirkung.

DAVIS und ALLEN (9) verwendeten als Substrat für die Messung der Ribonuclease-Wirkung Uridin - 2', 3' - Phosphat und Uridin - 3' - Benzyl-Phosphat. Die Spaltung wurde durch papierelektrophoretische Trennung der Reaktionsprodukte von den Substraten und UV-Messung der eluierten Flecken verfolgt.

B. METHODIK

Ausser der in dieser Arbeit verwendeten, von KUNITZ (10) erstmals angegebenen, spektralphotometrischen Methode wird die Ribonucleaseaktivität auch noch nach der manometrischen Methode von BAIN und RUSCH (11), sowie durch die Bestimmung des Phosphates im Überstand nach KUNITZ (3) gemessen.

Mehr als die Hälfte der hier erwähnten Autoren verwendeten in ihren Arbeiten die spektralphotometrische Methode, die sie, wie aus den Zitaten ersichtlich, zum Teil abwandelten. Häufiger wurde auch die Phosphatmethode von KUNITZ (3) zur Bestimmung der Aktivität der Ribonuclease herangezogen. Selten angewendet wurde dagegen die manometrische Methode von BAIN und RUSCH (11).

Eine ausführliche und kritische Betrachtung dieser Methoden und deren Mängel findet sich bei ZÖLLNER (5) und COHN und VOLKIN (6).

Ausführlicher beschrieben werden soll nur die in der vorliegenden Arbeit benutzte spektralphotometrische Bestimmung der Ribonucleaseaktivität nach KUNITZ (10). Der Abbau der RNS durch Ribonuclease führt, bei pH 5,0, zu einer Abnahme der Absorption der Säure im ultravioletten Bereich. Bei 300 nm ist die Abnahme der Absorption am deutlichsten.

Die Extinktionsmessungen wurden am Spektralphotometer und Monochromator M 4 Q der Fa. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt.

2 ccm der 0,1 % Lösung der RNS, gelöst in 0,2 mol Acetapuffer von pH 5,0, wurden mit 2 ccm der Lösung des Fermentes in Aqua bidest. rasch gemischt. Die Mischung wurde in Quarzküvetten in ein Ultra-

violett-Spektralphotometer gebracht und die Extinktion in kurz aufeinanderfolgenden Zeitabständen abgelesen, bis sie einen konstanten Wert erreichte.

Der verwendete Acetatpuffer setzte sich aus 7,05 Teilen 0,2 mol Na-Acetat und 2,95 Teilen 0,2 mol CH_3COOH zusammen.

Variationen der oben angegebenen Reagentien werden im Kapitel Ergebnisse mitgeteilt, da sie sich erst aus den Erfahrungen der jeweils vorangegangenen Versuche ergaben.

Ausführliche Überlegungen über die Berechnung der Aktivität enthält die Arbeit von ZÖLLNER (5). Hierin stellte er fest, dass die Kunitz-methode, trotz einiger Nachteile, nach wie vor ihre Anwendungsgebiete bei Arbeiten mit reinen oder verhältnismässig reinen Enzymlösungen hat; wie z.B. bei der Präparation des kristallinen Fermentes oder bei gewissen kinetischen Untersuchungen, in denen nicht die Aktivität einer gegebenen Lösung bestimmt, sondern lediglich diese Aktivität mit der einer anderen Lösung verglichen werden soll.

C. ANDERE RIBONUCLEASEN

Die Beobachtung von MAVER und GRECO (12), dass die Ribonucleaseaktivität eines Milzextraktes in bezug auf das pH andere Verhältnisse zeigt, wies auf die Existenz einer zweiten Ribonuclease hin.

KAPLAN und HEPPEL (13) haben die Ribonuclease, die sie aus Kälbermilz gewannen, 700fach gereinigt. Sie fanden das pH-Optimum in verschiedenen Puffern zwischen pH 6,0 und pH 6,5. Dieser Wert ist der einzige grössere Unterschied zur Pankreas-Ribonuclease (pH 7,7). Das Molekulargewicht wurde mit etwa 2000 bis 5000 angegeben, also wesentlich niedriger als jenes, welches für die Pankreas-Ribonuclease errechnet wurde.

In der Spezifität besteht Übereinstimmung zwischen beiden Enzymen insofern, als Ribonucleinsäure nur partiell abgebaut wird, die synthetischen Substrate Cytidin - 3' - Benzyl-Phosphat, Cytidin - 2', 3' -

Phosphat und Uridin - 2', 3' - Phosphat jedoch gespalten werden.

HOLDEN und PIRIE (14) gewannen aus Erbsenblättern eine Ribonuclease (ERN) die sich in verschiedener Hinsicht von der Pankreas-Ribonuclease (PRN) unterscheidet. ERN wird bei Temperaturen über 45 Grad C zerstört, hat das pH-Optimum bei 5, 5. ERN baut Nucleinsäure viel intensiver ab als PRN.

LAMIRANDE und Mitarbeiter (15) fanden in den Zellen normaler Rattenleber eine saure und eine alkalische Ribonuclease. Die pH-Optima liegen bei pH 5, 8 und pH 8, 2. Interessant ist das unterschiedliche Verhalten gegenüber Mg^{++} und Heparin, das später bei der Besprechung der Hemmstoffe der Ribonuclease erwähnt wird.

LINDIGKEIT (16) beschrieb zwei Ribonucleasen, die er in den roten Blutkörperchen von Kaninchen gefunden hatte. Diese zeichnen sich durch verschiedene Wirksamkeit gegenüber der in Reticulocyten vorhandenen RNS und der Hefe-RNS aus. Das Ferment, welches Reticulocyten-RNS abspaltet, besitzt ein pH-Optimum von 7, 5 und wird durch 10 Minuten Erhitzen auf 100 Grad C unwirksam. Es findet sich beim Abtrennen des Stromas vorwiegend in der überstehenden Flüssigkeit. Die Ribonuclease, welche Hefe-RNS abbaut, besitzt dagegen ein pH-Optimum von 6, 5, ist thermostabiler und befindet sich grösstenteils im Stroma. Unterschiede zwischen beiden Fermenten zeigen sich auch bei der Beeinflussung durch verschiedene Anionen und Kationen und gegenüber der Wirkung von Pankreas-Ribonuclease.

In einer später veröffentlichten Arbeit beschrieben LINDIGKEIT und RAPOPORT (17) nur noch die bei pH 7, 5 wirksame Ribonuclease. Sie befand sich nach Abzentrifugieren des Stromas in der überstehenden Lösung von Wasser- und Gefrierhämolysaten der roten Blutzellen anämischer Kaninchen. Diese Ribonuclease ist spezifisch für die roten Blutkörperchen.

ROTH (18) konnte zeigen, dass die Ribonuclease der Rattenleber sich von der Ribonuclease der Rattennieren unterscheidet. Die pH-Optima sind nicht gleich. Auch die Hemmung durch Ca^{++} und Mg^{++} ist bei beiden Geweben verschieden.

CRADDOCK und DALGLIESH (19) untersuchten Pankreas verschiedener Tierarten und des Menschen. Sie fanden, dass Rattenpankreas ungewöhn-

lich grosse Mengen Ribonuclease mit 10fach höherer spezifischer Aktivität als Rinderpankreas enthält.

Ausser den genannten Arbeiten liegen noch weitere Untersuchungen über die Ribonuclease in verschiedenen Geweben und Bakterienhomogenaten vor, die hier nicht alle erwähnt werden können.

D. HEMMSTOFFE DER RIBONUCLEASE

BAIN und RUSCH (11) sowie ZITTLE und READING (20) beobachteten, dass Nucleinsäuren, die Kupfer enthalten, von der Ribonuclease langsamer als kupferfreie Präparate angegriffen werden. MASSART, PEETER und VANHOUCKE (21) fanden mit histochemischen Methoden eine Hemmung der Ribonuclease durch Penicillin. COHEN (22) und DEKEN-GRENSSEN (23) zeigten, dass Streptomycin die Ribonuclease hemmt.

ROTH (24) und ZÖLLNER und FELLIG (25 und 26) haben die Hemmung der Ribonuclease durch Heparin studiert.

ROTH (24) untersuchte neben kristalliner Pankreas-Ribonuclease auch Leber- und Nieren-Ribonuclease. Sie zeigen alle gegenüber Heparin ein gleiches Verhalten, ebenso gegenüber Treburon, einem synthetischen Polygalakturonsäureschwefelsäureester. 2-Aminobenzimidazol hemmt bei $1,7 \cdot 10^{-2}$ m das Pankreasferment um rund 50 %.

ZÖLLNER und FELLIG (25 und 26) sowie ZÖLLNER (27) haben in eingehenden Untersuchungen nachgewiesen, dass nur Heparin und nicht andere verwandte Polysaccharide für die Hemmung der Ribonuclease verantwortlich ist. Die Hemmung ist an die bei der Elektrophorese bei pH 7,7 wandernde Komponente des Heparins gebunden. Die Hemmung ist kompetitiv, sie erreicht 50 % bei pH 5,0 wenn die Heparinkonzentration 1,25 % derjenigen von Ribonucleinsäure beträgt. Bei pH 5,0 bis pH 7,5 nimmt die Hemmwirkung von Heparin mit zunehmenden pH-Werten ab. Ausserdem konnten die oben genannten Autoren zeigen, dass die Hemmung der Ribonuclease durch Heparin reversibel ist und diese Hemmung nicht durch Verunreinigungen des Heparins bedingt ist.

ROTH (28) gab die Hemmung der Ribonuclease aus Leberhomogenaten durch $4 \cdot 10^{-4} \text{ m Cu}^{++}$ mit rund 50 % an. KAPLAN und HEPPEL (13) dagegen fanden, dass Kupfer vollständig hemmt. Sie untersuchten, wie schon berichtet, gereinigte Milz-Ribonuclease aus Kälbermilz und auch gereinigte Pankreas-Ribonuclease.

LEDOUX (29) fand für Natrium-p-Chlor-Quecksilber (II)-Benzoat bei pH 7,5 eine sehr geringe, bei pH 9 dagegen jeweils nach 25 Minuten eine 50 %ige Aktivitätsminderung der Ribonuclease. In den ersten 20 Minuten kam es in jedem Falle zu einer Aktivierung des Fermentes. In einer weiteren Arbeit von LEDOUX (30) wird erwähnt, dass p-chloromercuribenzoates Natrium (PCMB) je nach den experimentellen Bedingungen hemmend oder aktivierend auf die Ribonuclease wirkt. Die Hemmung rührt von einer tatsächlichen Reaktion der PCMB mit der Ribonuclease her. Die Hemmung hängt ab vom pH, den relativen Konzentrationen und der Inkubationszeit. Sie ist reversibel (bei der Einwirkung von OH-Ionen und Glutathion) und wahrscheinlich mit der Inaktivierung der funktionellen SH-Gruppen gleichzusetzen.

Auch DICKMAN, AROSKAR und KROPF (31) finden, dass p-Chlor-Quecksilber (II)-Benzoat bei 10^{-3} Endkonzentration Ribonuclease um 32 % hemmt, jedoch nicht bei gleichzeitiger Anwesenheit von Gelatine oder Äthylendiamintetraacetat. Sie verwendeten Ribonucleinsäure (0,5 ml, 0,3 % auf passendes pH eingestellt) und Ribonuclease in zwei verschiedenen Puffern.

Im Gegensatz dazu berichten DAVIS und ALLEN (9) sowie RABINOVITCH und BARRON (32), dass Ribonuclease durch p-Chlormercuribenzoat keine Hemmung erfährt. DAVIS und ALLEN (9) betonen in ihrer Arbeit, dass der Widerspruch dieser Aussage mit Angaben der Literatur wohl auf die von ihnen vorgenommene Verwendung synthetischer Substrate zurückzuführen ist, da synthetische Substrate klarere Versuchsbedingungen ergeben.

Nach BRODY (33) hemmt Borat. Die Untersuchungen führte er an Homogenaten frischen Plazentagewebes aus.

1953 veröffentlichten ROTH und Mitarbeiter (34) Ergebnisse, die sie an mit insgesamt je 600 r ganzbestrahlten Ratten gewinnen konnten. Als Organpräparate dienten ihnen hierzu Gesamthomogenate von Leber und

Niere sowie Blutserum. Die Ribonuclease-Aktivität fiel am achten Bestrahlungstag auf ungefähr 25 % des Normalwertes ab und zeigte am zwölften Tage eine signifikante Erhöhung.

METAIS und MANDEL (35) untersuchten das Serum von Menschen. Sie fanden, dass bei krebserkrankten Patienten, die sich von der Normalgruppe nicht unterscheiden, der Ribonuclease-Wert auf weniger als die Hälfte absank, wenn sie einer therapeutischen Bestrahlung ausgesetzt wurden. Die Verfasser verwendeten 1 ml 0,2 % RNS in Veronalpuffer bei pH 7,7 und Serum, von dem sie 1 ml eine Stunde lang bei 60 Grad C hielten, das sie dann mit 4 ml Mac Fadyens Reagens enteiweisten (1,25 mg Uranylacetat und 10 g Trichloressigsäure pro 100 ml). 3 ml klares Zentrifugat verdünnten sie auf 20 ml und massen die Absorption bei 260 nm. Ausgedrückt in Gamma kristall. Pankreas-Ribonuclease/100 ml Serum, haben gesunde Menschen 61 ± 14 . Für verschiedene Krankheiten wurden die Werte mit 65 ± 19 errechnet. Krebskranke Patienten unterscheiden sich nicht von der Gruppe Gesunder. Nach therapeutischer Bestrahlung sank der Wert auf 26 ab.

LEDOUX (36) beobachtete, dass oxydiertes Glutathion und Jodoschweigsäure auf die Ribonuclease hemmend wirken. Die Hemmung ist bei der Einwirkung von Reduktionsmitteln reversibel, die Geschwindigkeit pH-abhängig. Die Enzymhemmung durch Luftsauerstoff und H_2O_2 wird von Metallionen (Cu^{++}) und Cyanid katalysiert. Nach Zerstörung des Oxydationsmittels sind die so behandelten Lösungen durch Reduktionsmittel reaktivierbar. Die Aktivität der Ribonuclease ist eine einfache Funktion des Redoxpotentials.

Zur Hemmung von Mg^{++} schreibt ROTH (18), der die Ribonuclease-Aktivität von wässrigen Rattenleber- und Rattennieren-Homogenaten untersuchte, Ca^{++} und Mg^{++} hemmen im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-4} m, aber in keinem Fall vollständig und bei beiden Geweben in unterschiedlichem Ausmass. MALLETT und LAMANNA (37) fanden bei der Einwirkung von Pankreas-Ribonuclease auf Heferibonucleinsäuren verschiedener Herkunft in 0,05 m Acetatpuffer bei pH 5,0 im Spektralbereich von 220 bis 280 nm eine Erhöhung der Extinktion um 7 % bis 15 %. Der enzymatische Abbau verschiedener Proben von RNS mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad zeigt einen sehr komplexen Verlauf. Mg -Ionen hemmen die Reaktion in noch ungeklärter Weise. Die Kinetik

wird stark durch das pH des Systems und die Wellenlänge, bei der die Messungen vorgenommen werden, beeinflusst.

LAMIRANDE und Mitarbeiter (15) beobachteten, dass die saure Rattenleber-Ribonuclease (Homogenat) von 0,003 m Mg^{++} um 25 % aktiviert wird, 250 Gamma Heparin/ccm hemmen 60 %. Das alkalische Enzym wird von 0,003 m Mg^{++} um 14 % gehemmt, 250 Gamma Heparin hemmen 16 %.

1955 teilten DAVIS und ALLEN (9) dagegen mit, dass von zweiwertigen Ionen nur Cu^{++} und Zn^{++} bei $2 \cdot 10^{-3}$ m praktisch vollständig hemmen. Ca^{++} , Mn^{++} und Mg^{++} sind dagegen bei selbst zehnmal höherer Konzentration wirkungslos. Diese Feststellung steht im Einklang mit einer 1956 von DICKMAN, AROSKAR und KROPF (31) gemachten Mitteilung, dass Mg^{++} nicht hemmt. Magnesium beeinflusst dagegen die Löslichkeit der Reaktionsprodukte und kann daher in bestimmten Versuchsanordnungen eine Hemmung vortäuschen. In Widerspruch zu LEDOUX (36) wird in beiden Arbeiten festgestellt, dass oxydiertes Glutathion ohne Einfluss auf das Enzym ist. Nach DAVIS und ALLEN (9) hat o-Jodosobenzoat - auch wieder im Gegensatz zu LEDOUX (36) - keinen Einfluss auf die Ribonuclease. HOLDEN und PIRIE (38) berichten, dass ERN durch $16 \mu M$ Zn^{++} , PRN durch $2 \mu M$ Zn^{++} um 30 % gehemmt wird. Die Photooxydation von Ribonuclease äussert sich in einer rapiden Inaktivierung des Enzyms, berichten WEIL und SEIBLES (39). Nach Aufnahme von 3 Mol O_2 /Mol Enzym ist das Ferment völlig inaktiviert.

VIGNAIS und MACHEBOEUF (40) schliessen aus ihren Versuchen, dass sehr hohe Drucke, 14000 at, die Ribonuclease insgesamt, mittlere aber nur die Hydrolyse der Hochpolymeren hemmen.

Die Fermentbestimmung erfolgte in der Arbeit von RABINOVITCH (41) spektrophotometrisch an wässrigen Homogenaten von Mäusepankreas bei pH 7,3. Fastenlassen über 24 bis 30 Stunden führt zu einer 20 bis 25 %igen Abnahme der Ribonucleaseaktivität, bezogen auf das Frischgewicht. Nach zweimal 600 Gamma Pilocarpinhydrochlorid i. v. im Abstand von 30 Minuten nimmt die Enzymaktivität um 33 % ab, wenn eine Stunde nach der Injektion untersucht wird. Zwölf Stunden nach der Injektion ist die ursprüngliche Aktivität wieder erreicht.

Nach DAVIS und ALLEN (9) hemmen alle Mononucleotide die Spaltung von Cytidin - 2', 3' - Phosphat in folgender Reihenfolge abnehmender Wirksamkeit bei Zugabe äquimolarer Mengen: Cytidilsäure, Uridylsäure, Guanylsäure, Adenosin - 2' - Phosphat, Adenosin - 5' - Phosphat, Adenosin - 3' - Phosphat. Die Spaltung von Uridin - 3' - Benzyl-Phosphat wird durch Uridylsäure, nicht aber durch Uridin oder Uracil gehemmt.

GRUBHOFFER (42) und CRESTFIELD, SMITH und ALLEN (43) berichteten 1955, dass sie mit Dodecylsulfat eine Hemmung der Ribonuclease gefunden haben. GRUBHOFFER (42) mass turbimetrisch die Niederschlagsbildung, die auftritt, wenn man Ribonuclease, Serumalbumin, Heparin, Germanin oder Dodecylsulfat bei pH 4,0 mit Ribonucleinsäure zusammenbringt. Am stärksten hemmte die Aktivität der Ribonuclease das Natriumdodecylsulfat, es folgten Desoxyribonucleinsäure, Germanin und Heparin.

CRESTFIELD, SMITH und ALLEN (43) extrahierten mit 2 % Dodecylsulfat aus Bäckerhefe bei pH 6,5 bis pH 6,7 (Phosphatpuffer) nach 3 Minuten Erhitzen etwa 90 % der vorhandenen RNS. Unter diesen Bedingungen bleibt die Enzymwirksamkeit von kristallisierter Ribonuclease vollständig gehemmt.

In der oben schon mehrfach genannten Arbeit von DICKMAN, AROSKAR und KROPF (31) teilen die Verfasser ebenfalls mit, dass anionische Netzmittel die Ribonuclease im Konzentrationsbereich zwischen 40 und 100 Gamma/ml weitgehend hemmen.

KALMAN und Mitarbeiter (44) inkubierten Ribonuclease mit Subtilisin. Sie fanden durch den proteolytischen Abbau einen Aktivitätsverlust, der aber bei verschiedenen Ribonucleasepräparationen nicht immer parallel geht. ANFENSEN (45) dagegen teilte im nächsten Heft der gleichen Zeitschrift mit, Veränderungen in der Peptidkette von Ribonuclease bedingen bei Einwirkung von Subtilisin keine Einschränkung der Aktivität. Mit Pepsin konnte er in kurzzeitigen Versuchen eine schnelle Abnahme der Fermentaktivität, innerhalb 16 Minuten bis auf 15 % der ursprünglichen Aktivität nachweisen.

Nickel und Kobalt hemmen die kristalline Pankreas-Ribonuclease. Und zwar findet ROTH (46) für Nickel eine 72 %ige Hemmung bei 2 Gamma Enzym/25 ml und $1,6 \cdot 10^{-3}$ m Metall und für Kobalt unter den gleichen Bedingungen eine 52 %ige Hemmung.

ERGEBNISSE

Zusammensetzung der Testlösungen:

a) Acetatpuffer (pH 5,0) :

7,05 Teile 0,2 mol Na-Acetat = 27,22 g CH_3COONa /ltr.

2,95 Teile 0,2 mol CH_3COOH

b) Substrat :

0,1 % Lösung von Na-Heferibonucleat in 0,2 mol Acetatpuffer

c) Fermentlösung :

0,001 g kristalline Pankreas-Ribonuclease ad 200,0 ccm

Aqua quarzbidest. = 5 Gamma Ribonuclease /ccm

d) Heparin-Lösung :

Die Stammlösung enthielt 200 Gamma Heparin pro ccm.

Verwendet wurde eine Charge kristallinen Heparins der

Fa. Hoffmann-La Roche.

Die Extinktionsmessungen wurden immer bei 300 nm am Spektralphotometer der Fa. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur vorgenommen.

A. VORVERSUCHE

2 ccm Substrat wurden mit 2 ccm Fermentlösung rasch gemischt. Diese Mischung wurde in Quarzküvetten in das Spektralphotometer gebracht und die Extinktion bei 300 nm in rasch aufeinanderfolgenden Zeitabständen abgelesen.

Nach einiger Übung gelang es schon 10 Sekunden nach der Mischung den ersten Wert abzulesen. Vorher wurde nach 20 Sekunden erstmals abgelesen. Es folgten Versuche, die zeigen sollten, ob geringere Ribonuclease-

mengen im Ansatz einen langsameren Extinktionsabfall zur Folge haben. Dies trat erwartungsgemäss ein. Eine Gegenüberstellung eines Versuches mit 5 Gamma Ribonuclease und eines Versuches mit 2 Gamma Ribonuclease im Ansatz zeigt die Verlangsamung des Reaktionsablaufes:

Zeit	A	A'	B	B'
20"	505	501	503	501
1'	499	491	498	498
2'	490	482	495	493
3'	485	478	490	490
4'	481	472	487	486
5'	480	470	483	481
6'	474	467	481	481
7'	472	464	480	480
8'	470	461	479	479
9'	468	459	478	477
10'	465	458	477	475
12'	462	453	472	472
15'	461	451	470	470
20'	456	450	468	468

TABELLE I

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle I :

A 2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2 ccm H₂O mit 5 Gamma Ribonuclease

A' Parallelversuch

B 2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2 ccm H₂O mit 2 Gamma Ribonuclease

B' Parallelversuch

Ein Abfall von 30 Skalenteilen vom Beginn der Messung an wurde mit 5 Gamma Ribonuclease im Ansatz nach etwa 5 Minuten erreicht, mit 2 Gamma erst nach etwa 12 Minuten.

Es schlossen sich Versuche mit Heparinzusatz an. Sie waren früher in der gleichen Weise schon von ZÖLLNER und FELLIG (25 und 26) durchgeführt worden. Die genannten Autoren prüften auch Ansätze mit 1,0 mg und 1,5 mg Ribonucleinsäure in der Testlösung. Für die Ansätze mit 2,0 mg Ribonucleinsäure errechneten sie bei 100 Gamma Heparinzusatz eine 6fache Hemmung. Auch in der hier vorliegenden Arbeit war im Durchschnitt eine 6fache Hemmung zu berechnen.

Ähnlich wie die in Tabelle II wiedergegebenen Teste verliefen alle übrigen unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuche.

Zeit	A	B	C	D	E
10"	543,5	564	545	542	565
20"	542	563,5	544,5	541	564
30"	540	563,5	544	539,5	563
60"	536	563	542,5	538,5	562
90"	533	562,5	541,5	537,5	560,5
2'	528	562	540,5	536,5	558
3'	522	561,5	540	535	555
4'	517	560	538	533	550
5'	510	559	536	530	545
6'	504	558	534	527,5	540
7'	500	557	532	524	536
8'	495	556	530	522	532
9'	492	553	-	-	-
10'	490	551	525	520	524
12'	483	549	522	516,5	520
15'	474	545	518,5	510	513,5
20'	468	541	515	504	506
25'		538,5			

TABELLE II

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle II :

2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2 ccm H_2O mit 5 Gamma Ribonuclease

dazu bei : A 0,5 ccm H_2O

B 0,5 ccm H_2O mit 100 Gamma Heparin

C 0,5 ccm H_2O mit 50 Gamma Heparin

D 0,5 ccm H_2O mit 25 Gamma Heparin

E 0,5 ccm H_2O mit 10 Gamma Heparin

Man extrapoliert aus dem Test die Extinktion des Ansatzes zum Zeitpunkt t_0 und errechnet v_i/v . v_i = die Geschwindigkeit der gehemmten, v = die der ungehemmten Reaktion. Zeichnet man in einem Koordinatensystem die errechneten v_i/v - Werte auf die Ordinate, die Heparinkonzentrationen auf die Abszisse, so geht die durch die aufgetragenen Werte gelegte Gerade durch 1. Wird bei den Versuchen von Tabelle II v_i/v für einen Extinktionsabfall von 20 Skalenteilen berechnet, so erhält man folgende Werte:

Bei 100 Gamma Heparin : 15 : 2,5 = 6,0

Bei 50 Gamma Heparin : 10 : 2,5 = 4,0

Bei 25 Gamma Heparin : 7,5 : 2,5 = 3,0

Bei 10 Gamma Heparin : 4,8 : 2,5 = 1,9

B. VERSUCHE MIT ZUSATZ VON KOCHSALZLÖSUNG

Um die Einwirkung von Kochsalz auf das System RNS - Ribonuclease zu prüfen, wurde eine 5 mol Kochsalzlösung zubereitet. Diese wurde dann mit Aqua bidest. zu einer 2,5 mol bis 0,25 mol NaCl-Lösung verdünnt (s. Tabelle III).

Die durchgeführten Versuche ergaben, dass selbst die 5 mol NaCl-Lösung, im Vergleich zu dem Leerversuch (Aqua bidest. statt Kochsalzlösung), die Ribonucleaseaktivität nicht hemmt, sondern geringfügig beschleunigt. Ausserdem zeigten die einzelnen zugesetzten Kochsalzlösungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivität der Ribonuclease. 0,25 mol bis 1,25 mol NaCl-Lösungen beschleunigten den Reaktionsablauf des RNS-Ribonuclease-Systems nahezu auf das Doppelte. Dagegen war die 2,5 mol Kochsalzlösung nicht immer sehr signifikant beschleunigend.

Zeit	A	B	C	D	E	F
10"	478	464	436,5	428,5	421	406
20"	477	462,5	433	426	419	405
30"	476	461	430,5	423,5	416,5	404
60"	473,5	458	428	418	412,5	400
90"	471	453	422	412,5	410,5	398
2'	469	450	419,5	410	408,5	395
3'	468	446	415,5	405,5	403,5	390,5
4'	466	440,5	410,5	401,5	399,5	388
5'	463,5	438	406,5	399,5	397	384,5
6'	461,5	433	401,5	395,5	393,5	381
7'	460	429,5	400	393	391,5	379,5
8'	459	423,5	397	390,5	390	378,5
9'	457	420	394	387	388,5	377
10'	454	419	391	383,5	387	374
15'	444	412	385	378	379	370
20'	438	405	378	370	371	366,5
120'	-	369	340	340	337	350

TABELLE III

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle III :

2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

1 ccm H₂O mit 5 Gamma Ribonuclease

1,5 ccm Aqua bidest.

dazu bei : A 0,5 ccm H₂O

B 0,5 ccm 0,25 mol NaCl-Lösung

C 0,5 ccm 0,625 mol NaCl-Lösung

D 0,5 ccm 1,25 mol NaCl-Lösung

E 0,5 ccm 2,5 mol NaCl-Lösung

F 0,5 ccm 2 mol NaCl-Lösung

Aus der vorangegangenen Versuchsreihe war bekannt, dass Kochsalzlösungen in bestimmten Konzentrationen die Ribonucleaseaktivität fördern. In einer neuen Reihe von Versuchen wurde untersucht, ob die zugesetzte, 0,25 mol Kochsalzlösung einen Einfluss auf die Hemmwirkung des Heparins hat. Zu diesem Zweck liefen zwei unterschiedlich beschickte Testserien nebeneinander, die eine mit 0,5 ccm H₂O, die andere mit 0,5 ccm 0,25 mol Kochsalzlösung (siehe Tabelle IV).

Zeit	A	B	C	A'	B'	C'
10"	450	458,5	459	462	468	480
20"	448	457,5	458	461,5	467,5	478,5
30"	442,5	457	457	461	466,5	477
60"	438	454,5	453	458	465	475,5
90"	432	452	450,5	455	463,5	474
2'	428	449	448,5	452	462,5	473
3'	420	445,5	443	448	461,5	472
4'	416	441,5	439,5	442,5	460,5	470,5
5'	411	439	437	439	460	470
6'	407	436,5	432,5	436	459,5	469
7'	402	433,5	430	432,5	459	468
8'	398	431,5	425	429,5	459	466,5
9'	393,5	430	421,5	426,5	459	463
10'	390	428	420	422	459	461,5
15'	380	420	413,5	412	457	460
20'	373	410	409,5	402	456	458

TABELLE IV

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle IV :

2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2 ccm H₂O mit 10 Gamma Ribonuclease

dazu bei: A 0,5 ccm 0,25 mol NaCl + 0,5 ccm H₂O

B 0,5 ccm 0,25 mol NaCl + 0,5 ccm H₂O mit 100 Gamma Heparin

C 0,5 ccm 0,25 mol NaCl + 0,5 ccm H₂O mit 50 Gamma Heparin

- A' 0,5 ccm H_2O + 0,5 ccm H_2O
 B' 0,5 ccm H_2O + 0,5 ccm H_2O mit 100 Gamma Heparin
 C' 0,5 ccm H_2O + 0,5 ccm H_2O mit 50 Gamma Heparin

Zwischen den verschieden beschickten Versuchen bestand kein wesentlicher Unterschied. Sie bestätigten nur die in vorangegangenen Untersuchungen gemachte Erfahrung mit 0,25 mol Kochsalzlösung. Versuche mit 0,5 ccm 0,25 mol NaCl-Lösung liefen etwas schneller ab als jene, denen statt dessen 0,5 ccm H_2O zugesetzt war.

Errechnet man v_i/v für die Versuche mit 0,25 mol Kochsalzlösung, so erhält man bei 100 Gamma Heparin pro 0,5 ccm H_2O den Wert 3,46, bei 50 Gamma Heparin pro 0,5 ccm H_2O den Wert 2,33; für die Versuche mit H_2O an Stelle der Kochsalzlösung bei 100 Gamma Heparin 3,94, bei 50 Gamma Heparin 2,36.

C. VERSUCHE MIT ZUSATZ VON SERUM

Bei dem Versuch dem RNS-Ribonuclease-System Serum zuzusetzen traten die gleichen Schwierigkeiten auf, die schon von anderen Autoren beschrieben wurden. Nach Einpipettieren von Serum bildete sich sofort eine Trübung durch Ausfällung unlöslicher Serumproteine. Eine Messung der Ribonucleaseaktivität war unter diesen Umständen unmöglich. Teilweise schien die Trübung zu Beginn der spektralphotometrischen Messung sogar noch stärker zu werden, so dass die Absorption zunahm. Dieser Effekt beruht sehr wahrscheinlich darauf, dass die Ausflockung der Serumproteine in der Küvette anfangs zwar gleichmässig einsetzt, beim Sedimentieren dann aber nach einiger Zeit im unteren Bereich der Küvette, durch den der Strahl der UV-Leuchte, der die Photozelle trifft, geht, eine Ballung dieser ausgeflockten Serumproteine eintritt.

Nachdem verschiedene Variationen des Testansatzes keine Lösung dieses Problems gebracht hatten, fiel auf, dass bei Zugabe von 1 ccm 0,25 mol Kochsalzlösung zu 0,1 ccm Serum im Ansatz praktisch keine Trübung auftrat. Da Serum in höherer Konzentration wiederum eine Bildung von unlöslichen, stark trübenden Serumproteinen in der zu prüfenden Lösung verursachte, wurden Versuche mit 1,0 ccm 5 mol Kochsalzlösung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es mit 5 mol Kochsalz-

lösung in 4,5 ccm Testvolumen selbst bei Zugabe von 0,5 ccm Serum nicht mehr zur Ausfällung unlöslicher Serumproteine kam.

In weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, ob ein Unterschied im Extinktionsabfall und damit der Ribonucleaseaktivität besteht, wenn man die Wirkung eines Zusatzes von Serum und physiologischer Kochsalzlösung mit der eines Zusatzes von Aqua bidest. und physiologischer Kochsalzlösung zum RNS-Ribonuclease-System vergleicht. Da sich, wie aus Tabelle V ersichtlich, gezeigt hatte, dass die Teste mit Serum rascher abliefen als diejenigen ohne Serum, lag die Annahme nahe, dass eine Gesetzmässigkeit zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der jeweiligen Serumkonzentration besteht. Diese Annahme liess sich auf Grund zahlreicher Versuche jedoch nicht bestätigen. Denn $v = 1/t$ bei Delta - 30 ergab keine reproduzierbare Gesetzmässigkeit, Delta - 30 = Extinktionsabfall um 30 Skalenteile.

Zeit	A	B	C	D	A'	B'	C'	D'
10"	560,5	401,5	328	299	251	246	247	251
20"	558	398	325	296	249	244	245	249
30"	555,5	395	321	291,5	246	241,5	242	247
60"	547,5	390	317	287	240	238,5	239	242,5
90"	543,5	387,5	313,5	284	237,5	235	237	240
2'	541	385	311	282	235	231,5	235	238
3'	539	383	309	280	232,5	230	232,5	235
4'	537	380	307	278	231	229	230,5	232,5
5'	534	378	305	275	230	228	229,5	230,5
6'	531	376	303	273,5	229,5	225,5	228,5	229,5
7'	528	374,5	301,5	272	229	223,5	227,5	228,5
8'	526,5	373	300,5	271	228,5	222	226,5	228
9'	525	372	300	270	228	221	225,5	227
10'	523,5	371	299,5	269	227,5	220,5	224,5	226,5
15'	521,5	369,5	297	267	223,5	219,5	221,5	222,5
20'	520	369	290	262	221	218,5	219	220,5

TABELLE V

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle V :

2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2 ccm H₂O mit 10 Gamma Ribonuclease

1 ccm 5 mol NaCl-Lösung

dazu bei :	A	0,2	ccm Serum + 0,8	ccm physiolog. NaCl
	B	0,1	ccm Serum + 0,9	ccm physiolog. NaCl
	C	0,05	ccm Serum + 0,95	ccm physiolog. NaCl
	D	0,03	ccm Serum + 0,97	ccm physiolog. NaCl
	A'	0,2	ccm H ₂ O + 0,8	ccm physiolog. NaCl
	B'	0,1	ccm H ₂ O + 0,9	ccm physiolog. NaCl
	C'	0,05	ccm H ₂ O + 0,95	ccm physiolog. NaCl
	D'	0,03	ccm H ₂ O + 0,97	ccm physiolog. NaCl

v = 1/t bei Delta - 30 ergibt für	A = 1,0 : 5,4 = 0,185
	B = 1,0 : 8 = 0,125
	C = 1,0 : 9 = 0,111
	D = 1,0 : 9 = 0,111

$$A' B' C' D' = 1,0 : 20 = 0,05$$

Mehr als 0,2 ccm Serum kann man der zu prüfenden Mischung nicht begeben, da man damit am Messgerät in hohe ungenaue Messbereiche kommt. Jenseits des Skalenwertes 500 sind die Abstände zwischen zwei benachbarten Skalenteilen so gross, dass Einerwerte nur mehr geschätzt werden können.

Geprüft wurde nunmehr ob der Reaktionsablauf von Testansätzen mit verschieden grossen Konzentrationen kristalliner Pankreas-Ribonuclease und 0,1 bzw. 0,2 ccm Serum demjenigen ohne kristalline Ribonuclease gleicht. Anfangs stand leider manchmal nur leicht hämolytisches Serum zur Verfügung, so dass einige Tests mit Zugabe von nur 0,1 ccm Serum ausgeführt werden mussten. Wurden grössere Mengen hämolytischen Serums zugesetzt, dann kam man in so ungünstige Messbereiche, dass eine genaue Ablesung nicht mehr möglich war. Befand sich bei diesen Versuchen nur Serum ohne kristalline Ribonuclease in der Testlösung, dann wurde mit Aqua bidest. auf dasselbe Volumen aufgefüllt wie es die zu prüfende Mischung mit Ribonuclease hatte.

Wie aus Tabelle VI hervorgeht, gleichen die Werte der Teste mit Serum ohne Ribonucleasezusatz in keinem Falle denen mit Serum und Ribonuclease. Nachdem sieben Versuche mit gleichem Testansatz immer dasselbe Ergebnis zeigten, wurde die Reihe abgebrochen.

Zeit	A	B	C	D
10"	471,5	472,5	479,5	471,5
20"	471	471,5	478,5	470,5
30"	470,5	470,5	477	470
60"	470	469	473	468
90"	469,5	467	471	466
2'	469	463,5	469	463,5
3'	468	460	465,5	461
4'	467	457,5	462,5	460
5'	466	454,5	461,5	459
6'	465	453	461	458
7'	464,5	451,5	460	457
8'	463,5	450,5	459,5	456
9'	463	450	459	455
10'	462,5	449,5	459	455
15'	462	448	458,5	453
20'	461,5	448	458	452
25'	461			

TABELLE VI

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle VI :

2 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2 ccm H₂O mit bzw. ohne Ribonuclease

1 ccm 5 mol NaCl-Lösung

0,2 ccm Serum

1,8 ccm physiolog. NaCl-Lösung

bei :	A	2 ccm Aqua bidest.
	B	2 ccm H ₂ O mit 10 Gamma Ribonuclease
	C	2 ccm H ₂ O mit 5 Gamma Ribonuclease
	D	2 ccm H ₂ O mit 2,5 Gamma Ribonuclease

Wird auf Grund der vorhergehenden Versuche angenommen, dass im Serum gesunder Menschen keine Pankreas-Ribonuclease vorhanden ist, so mussten die Versuche von Tabelle VII dies bestätigen oder das Gegenteil beweisen. In den bisher beschriebenen Untersuchungen konnten genügend Erfahrungen über den Reaktionsablauf des RNS-Ribonuclease-Systems gesammelt werden. Wenn im Serum Pankreas-Ribonuclease vorhanden wäre, müsste sie die angebotene Ribonucleinsäure genau so abbauen wie es bisher die kristalline Pankreas-Ribonuclease tat. Das heisst, es müsste sich das Absorptionsspektrum für Ansätze mit Serum wie für Ansätze mit kristalliner Pankreas-Ribonuclease im gleichen Zeitraum in der gleichen Weise ändern. Um diese Frage zu klären, wurden im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen (s. Tabelle VI) erst Mischungen angesetzt, die nur kristalline Pankreas-Ribonuclease enthielten. Später wurden 0,2 ccm Serum zugegeben. Danach wurden die Lösungen so angesetzt, dass Substrat, 5 mol Kochsalzlösung und physiologische Kochsalzlösung in ein Reagenzglas einpipettiert wurden. Zehn Sekunden vor der Messung wurde Serum zugegeben. Nachdem die Extinktionsmessung keine Änderung der Absorption mehr anzeigte, wurde der Küvetteninhalt in das Reagenzglas zurückgeschüttet und die Küvette mit Aqua bidest. dreimal ausgespült. Um möglichst geringe Wasserrückstände in der Küvette zu haben, die die Messungen nicht beeinträchtigen, wurde sie über Filterpapier rasch ausgeklopft. Das Spülen und Ausklopfen war meist in weniger als einer Minute beendet. Nachdem die Küvette wieder in den Küvettenhalter gestellt worden war, wurden nun in das Reagenzglas 2 ccm Ribonucleaselösung zupipettiert und gemischt. Rasch wurde die Küvette über die Hälfte gefüllt und zur Absorptionsmessung in den Strahlengang der UV-Leuchte gebracht. Da die Zugabe des Serums kurz vor Beginn der Messung ungünstig ist, wurde in den Versuchen von Tabelle VII die Reihenfolge der Einpipettierungen geändert. Und zwar wurden zuerst 5 mol Kochsalzlösung, physiolog. Kochsalzlösung, Aqua bidest, Heparinlösung und Serum im Reagenzglas gemischt. Substrat wurde erst 15 Sekunden vor Beginn der Messung zugegeben.

Zeit	A	B	C	D	E
15"	530	528	526	531,5	536
30"	526	525	524,5	529,5	535
60"	523	523	522,5	526,5	534,5
90"	522	522	521	524,5	533,5
2'	521	521,5	520	523	531,5
3'	520	521	519	522,5	528,5
4'	519	520,5	518,5	522	527,5
5'	518,5	520,5	518	522	527
10'	518,5	520,5	518	522	527

Ribonuclease wird zupipettiert

11' 10"	402,5	397	415	428	416,5
11' 20"	399,5	395	414	426	414,5
11' 30"	397	393	412,5	423,5	412,5
12'	393	391	410	419,5	408,5
13'	391	388	407	416	405
14'	389	386	404	413,5	402,5
15'	387	384	401	411,5	400,5
16'	385	382	399	410	399
17'	383	380,5	398	409	397
18'	381,5	379,5	397	408	395,5
19'	380,5	378,5	395,5	407	394,5
20'	380	378	394	406	394
25'	379,5	375	392	404	393,5
30'		373	390	402,5	393

TABELLE VII

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle VII :

1,0 ccm 5 mol NaCl-Lösung

1,8 ccm physiolog. NaCl-Lösung

1,0 bzw. 2,0 ccm Aqua bidest. (A 2,0 ccm H₂O, B - E 1,0 ccm H₂O)

1,0 ccm Heparinlösung (B - E)

0,2 ccm Serum

2,0 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)
 2,0 ccm Ribonucleaselösung (mit 10 Gamma Ribonuclease)
 bei : B 100, C 50, D 25 und E 10 Gamma Heparin

Errechnet man $v = 1/t$ bei Delta - 20, so erhält man für:

100 Gamma Heparin (B)	1 : 11 = 0,0909
50 Gamma Heparin (C)	1 : 8,5 = 0,117
25 Gamma Heparin (D)	1 : 7,0 = 0,142
10 Gamma Heparin (E)	1 : 6,8 = 0,146
H ₂ O statt Heparin (A)	1 : 6,5 = 0,153

Dieses Ergebnis war nicht befriedigend, weil zwischen der Heparinmenge und der Hemmung der Ribonucleaseaktivität keine Beziehung aufgestellt werden konnte. Rechnet man v_i/v aus, so erhält man bei 100 Gamma Heparin eine nur etwa 2fache Hemmung. Alle sechs Versuche dieser Reihe zeigten eine geringgradige Hemmung durch Heparin.

Da die Aktivität der kristallinen Ribonuclease-Lösung in dem bisher üblichen Verhältnis 10 Gamma Ribonuclease auf 2 mg Na-Heferibonucleat nicht mehr ausreichend war, wurden 15 Gamma Ribonuclease gegen 1 mg Na-Heferibonucleat geprüft.

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle VIII :

1,0 ccm 5 mol NaCl-Lösung
 1,8 ccm physiolog. NaCl-Lösung
 1,0 bzw. 2,0 ccm Aqua bidest. (A 2,0 ccm H₂O, B - E 1,0 ccm H₂O)
 1,0 ccm Heparinlösung (B - E)
 0,2 ccm Serum
 1,0 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)
 3,0 ccm Ribonucleaselösung (mit 15 Gamma Ribonuclease)
 bei : B 100, C 50, D 25, E 10 Gamma Heparin

Zeit	A	B	C	D	E
15"	442	440	440	450	440,5
30"	441	439	439,5	449	440
60"	440	437,5	439	447,5	439,5
2'	438,5	436	438,5	445	439
3'	437,5	434,5	438	443	438,5
4'	436,5	433	437,5	442	438
5'	435,5	432,5	437	441,5	437,5
10'	435,5	432,5	437	441,5	437,5
15'	435,5	432,5	437	441,5	437,5

Ribonuclease wird zupipettiert

16' 10"	320	311,5	310,5	278,5	298
16' 20"	317	310	308,5	276	296
16' 30"	313	308,5	306	272,5	293
17'	311	303,5	302,5	270,5	291
18'	310	301,5	301	269,5	289
19'	309	300,5	300	268,5	287
20'	308,5	300	299	268	286
21'	307,5	299	298,5	267	285,5
22'	307	298,5	298	266	285,5
23'	306,5	298	298	265,5	285,5
24'	306,5	297	297,5	265	285,5
25'	306,5	296,5	297	265	285
30'	306,5	296,5	297	265	285
35'	306,5	296,5	297	265	285

TABELLE VIII

Im allgemeinen verliefen die Versuche von Tabelle VIII genau so wie die vorangegangenen von Tabelle VII. Bei 100 Gamma Heparin in 9 ccm Gesamtvolumen der Mischung wurde ebenfalls nur eine kaum mehr als zweifache Hemmung erzielt. In diesen Versuchen wurde während der ganzen Versuchsreihe ein und dasselbe Serum verwendet. Es liess sich kein Hinweis dafür finden, dass verschiedene Sera unterschiedliche Reaktionsabläufe bedingen. Auch änderte sich während der Woche, in der immer das gleiche Serum verwendet worden war, die Aktivität des Serums nicht. Das Serum wurde im Eisschrank aufbewahrt und nur die für die Messungen benötigte Menge jeweils auf Zimmertemperatur gebracht. In den bisherigen Versuchen wurde zuerst die Serumaktivität gemessen. Es hatte sich gezeigt, dass bereits 10 Minuten nach Beginn der Messung keine Serumaktivität mehr nachzuweisen war. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen Serum vorinkubiert, die Mischung 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und die Extinktionsmessung des Testansatzes erst nach der Ribonucleasezugabe begonnen. Um zu vermeiden, dass diese Umstellung den Ablauf der Reaktion ändert und andere Ergebnisse vortäuscht, blieb die Zusammensetzung der Testansätze von Tabelle IX denen von Tabelle VIII praktisch gleich. Da die Aktivität der kristallinen Ribonucleaselösung in den letzten Versuchen abgenommen hatte, wurde eine neue Lösung angesetzt. Auch das Substrat wurde neu angesetzt. Darum konnte man in diesen Versuchen wieder zu dem früher üblichen RNS-Ribonuclease-Verhältnis übergehen (10 Gamma Ribonuclease auf 1 mg Ribonucleinsäure).

Testansatz zu den Versuchen von Tabelle IX :

1,0 ccm 5 mol NaCl-Lösung

1,8 ccm physiolog. NaCl-Lösung

1,0 bzw. 2,0 ccm Aqua bidest. (A 2,0 ccm H₂O, B - E 1,0 ccm H₂O)

1,0 ccm Heparinlösung (B - E)

0,2 ccm Serum

2,0 ccm Substrat (0,1 % Na-Heferibonucleat)

2,0 ccm Ribonucleaselösung (mit 10 Gamma Ribonuclease)

bei : B 100, C 50, D 25, E 10 Gamma Heparin

Auch bei diesen Testen ergaben 100 Gamma Heparin nur eine zweifache Hemmung.

Zeit	A	B	C	D	E
10"	390,5	380	386	389	378,5
20"	388	378	384	387	375,5
30"	385,5	376	382	384,5	372,5
1'	381	372	379	380,5	370,5
2'	379	369	376	379	369,5
3'	378	367	374	378,5	369
4'	376,5	366	372	378	368,5
5'	375	365	371	377	368
6'	374,5	364,5	370,5	376	367
7'	374	364	370	375	365,5
8'	373	363,5	369,5	374	364
9'	372,5	363	369	372,5	362
10'	372	362,5	368,5	371,5	360
15'	370	362	363,5	369,5	356,5
20'	369,5	361	361,5	368,5	354

TABELLE IX

In einer Parallel-Versuchsreihe wurde die übliche Heparinkonzentration einmal mit 0,2 ccm Serum, das andere Mal mit 0,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung getestet. Die Ansätze waren denen der früheren Versuche gleich. In beiden Reihen wurde für 100 Gamma Heparin nur eine zweifache Hemmung gefunden.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit gelang es die Ausflockung der Serumproteine durch Zugabe von Kochsalzlösung zu Ribonucleinsäure und Serum zu verhindern. Damit konnte die bisher übliche, langwierige Enteiweissung des Serums umgangen werden.

2 ccm 0,25 mol Kochsalzlösung mit 0,1 ccm Serum bei einem Gesamtvolumen von 5 ccm zeigte praktisch keine Trübung des Testansatzes. Bei 0,2 ccm Serum im gleichen Ansatz trat dagegen sofort wieder Trübung durch Ausflockung ein. Um diese Ausflockung bei grösseren Serumkonzentrationen im Testansatz unbedingt zu vermeiden wurde jeweils eine 5 mol Kochsalzlösung verwendet. Die 5 mol Kochsalzlösung hemmte die Aktivität der Ribonuclease im Vergleich zu Aqua bidest. nicht. Es war eher eine leichte Beschleunigung des Reaktionsablaufes nachzuweisen. 0,25 mol bis 1,25 mol Kochsalzlösung beschleunigte die Aktivität der Ribonuclease nahezu auf das Doppelte.

Auf Grund der durchgeführten Versuche lässt sich nicht entscheiden ob im Serum des Menschen nur sehr wenig oder gar keine Pankreas-Ribonuclease vorhanden ist. Während man für nur 2,5 Gamma Ribonuclease in einer Mischung von 5 bzw. 6 ccm Gesamtvolumen eine Absorptionsabnahme von mindestens 25 Skalenteilen erhält, ergeben 0,2 ccm Serum in dem gleichen Volumen nur eine Extinktion von zehn Skalenteilen. Die Aktivität des Serums ist in einer Mischung von Ribonucleinsäure und 5 mol Kochsalzlösung bereits nach etwa zehn Minuten beendet. Gibt man dann eine Lösung kristalliner Ribonuclease dazu, so kommt die Reaktion mit der Ribonucleinsäure wieder in Gang. Die Extinktion beträgt dann wie in Versuchen ohne Vorinkubation von Serum wieder etwa 25 Skalenteile. Damit wird jedoch nicht bewiesen, dass im Serum keine Pankreas-Ribonuclease vorhanden ist. Parallelversuche mit einerseits verschiedenen grossen Serumkonzentrationen und andererseits Aqua bidest. zum RNS-Ribonuclease-System zeigten, dass die Reaktion bei Serumzusatz schneller abläuft. Es besteht die Möglichkeit, dass die im Serum vorhandene Ribonuclease nicht oder nicht nur aus dem Pankreas kommt. Sie könnte auch aus anderen Organen oder aus den Blutzellen stammen.

Die Hemmung der Ribonucleaseaktivität durch Heparin blieb bei vergleichenden Untersuchungen mit einmal Aqua bidest. und einmal 0,25 mol Kochsalzlösung gleich. Es bestand nur insofern ein Unterschied als alle Versuche mit 0,25 mol Kochsalzlösung rascher abliefen. 5 mol Kochsalzlösung drängt die Hemmwirkung des Heparins offensichtlich zurück. Versuche mit Heparin zum RNS-Ribonuclease-System ohne Kochsalzlösung hatten für 100 Gamma Heparin eine sechsfache Hemmung ergeben. Durch Zusatz von 5 mol Kochsalzlösung wurde für 100 Gamma Heparin nurmehr eine wenig mehr als zweifache Hemmung erzielt. Es wird vermutet, dass die Zurückdrängung der Hemmwirkung des Heparins auf die Ribonucleaseaktivität auf einer Hemmung der Bildung des Ribonuclease - Heparinkomplexes durch 5 mol Kochsalzlösung beruht.

Im allgemeinen wurden von jedem hier aufgezeichneten Versuch sieben bis acht Kontrolluntersuchungen durchgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet die Aktivität der im Serum vorhandenen Ribonuclease ohne die langwierige Enteiweissung des Serums spektralphotometrisch zu verfolgen. Durch Zugabe von 5 mol Kochsalzlösung gelang es die Bildung unlöslicher Serumproteine zu verhindern. 5 mol Kochsalzlösung hemmt das RNS - Ribonuclease - System nicht. Die Hemmwirkung des Heparins wird auf etwa ein Drittel zurückgedrängt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Jones W. J. Biol. Chem. 12, 31 (1912)
2. Dubos R. J. Science 85, 549 (1937)
3. Kunitz M. J. Gen. Physiol. 24, 15 (1940)
4. Rothen A. J. Gen. Physiol. 24, 203 (1940)
5. Zöllner N. Habilitationsschrift, München 1954
6. Cohn W. E. und E. Volkin Annual Rev. Biochem. 26, 495 (1957)
7. Mc Donald M. R. Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.)
18, 138 (1955)
8. Richrads F. M. C. r. Trav. Labor. Carlsberg Sér.
chim. 29, 315 (1955)
9. Davis F. F. und F. W. Allen J. Biol. Chem. 217, 13 (1955)
10. Kunitz M. J. Biol. Chem. 164, 563 (1946)
11. Bain J. A. und H. P. Rusch J. Biol. Chem. 153, 659 (1944)
12. Maver M. E. und A. E. Greco
J. Biol. Chem. 181, 861 (1949)
13. Kaplan H. S. und L. A. Heppel
J. Biol. Chem. 222, 907 (1956)
14. Holden M. und N. W. Pirie Biochem. J. 60, 39 (1955)
15. Lamirande G. de, C. Allard, H. C. da Costa und A. Cantero
Science (Lancaster, Pa.) 119, 351
(1954)
16. Lindigkeit R. zit. n. Rona, Ber. d. ges. Physiol.
u. d. experiment. Pharmakol. 172,
175 (1955)

17. Lindigkeit R. und S. Rapoport *Naturwissenschaften* 42, 127 (1955)
18. Roth J.S. *J. Biol. Chem.* 208, 181 (1954)
19. Craddock V.M. und C.E. Dalglish
Bull. Soc. chim. Belge 65, 76 (1956)
20. Zittle C.A. und E.H. Reading
J. Biol. Chem. 160, 519 (1945)
21. Massart L., G. Peeters und A. Vanhoucke
Experientia 3, (Basel) 494 (1947)
22. Cohen S.S. *J. Biol. Chem.* 168, 511 (1947)
23. Deken-Grensen, de *Arch. intern. physiol.* 63, 256 (1955)
24. Roth J.S. *Arch. of Biochem. a. Biophysics* 44, 265 (1953)
25. Zöllner N. und J. Fellig *Naturwissenschaften* 39, 523 (1952)
26. Zöllner N. und J. Fellig *Amer. J. Physiol.* 173, 223 (1953)
27. Zöllner N. *Z. physiol. Chem.* 291, 212 (1952)
28. Roth J.S. *Nature (London)* 171, 127 (1953)
29. Ledoux L. *Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.)* 10, 190 (1953)
30. Ledoux L. *Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.)* 11, 517 (1953)
31. Dickman S.R., J.P. Aroskar und R.B. Kropf
Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.) 21, 539 (1956)
32. Rabinovitch M. und E.S.G. Barron
Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.) 18, 316 (1955)

33. Brody S. *Acta chem. scand. (Copenh.)* 7,
721 (1953)
34. Roth J.S., H.J. Eichel, A. Wase, C. Alper und M.J. Boyd
Arch. of Biochem. a. Biophysics 44,
95 (1953)
35. Métais P. und P. Mandel *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 37, 999
(1955)
36. Ledoux L. *Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.)*
13, 121 (1954)
37. Mallette M.F. und C. Lamanna
Arch. of Biochem. a. Biophysics 51,
217 (1954)
38. Holden M. und N.W. Pirie *Biochem. J.* 60, 53 (1955)
39. Weil L. und T.S. Seibles *Arch. of Biochem. a. Biophysics* 54,
368 (1955)
40. Vignais P. und M. Macheboeuf
Ann. Inst. Pasteur (Paris) 86, 180
(1954)
41. Rabinovitch M. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* 85
685 (1954)
42. Grubhofer N. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*
302, 217 (1955)
43. Crestfield A.M., K.C. Smith und F.W. Allen
J. Biol. Chem. 216, 185 (1955)
44. Kalman S.M., K. Linderström-Lang, M. Attesen und F.M. Richards
Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.)
16, 297 (1955)
45. Anfinsen C.B. *Biochim. et Biophysica Acta (Amsterd.)*
17, 593 (1955)
46. Roth J.S. *Exper. Cell Res.* 10, 146 (1956)

Lebenslauf

Am 28. Juli 1926 wurde ich in Klogsdorf, CSR, geboren. Mit sechs Jahren trat ich in die Volksschule ein, mit elf Jahren in die Oberschule für Jungen in Freiberg. 1944 wurde ich zur Wehrmacht eingezogen. Ich erhielt den Reifevermerk. Im Wintersemester 1947 nahm ich am Förderungskurs der Phil.-Theol. Hochschule in Dillingen (Donau) teil. Im Sommersemester 1948 begann ich an der Phil.-Theol. Hochschule in Regensburg das Medizinstudium. Vom Wintersemester 1950/51 bis Sommersemester 1953 studierte ich an der Universität München, wo ich 1954 die ärztliche Prüfung ablegte. Seit Februar 1956, nach Ableistung der Pflichtassistentenzeit, bin ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München als Arzt tätig.

